

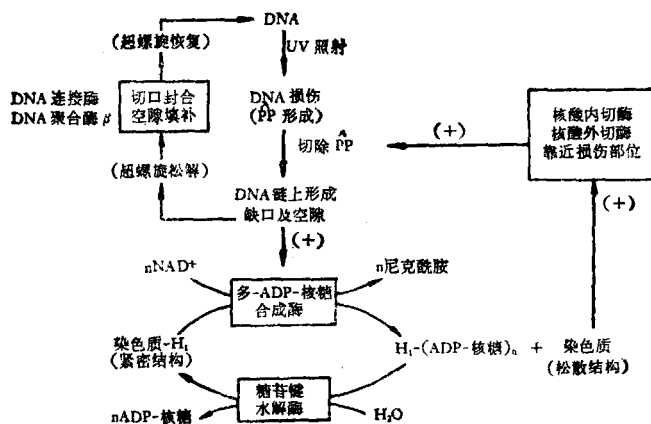


图3 多-ADP-核糖基化和 DNA 切除修复的关系
(+): 促进或激活 H₁: 组蛋白 H₁ PP: 嘧啶二聚体

转变为松散结构时,将使 DNA 上的损伤部位进一步暴露,必然有利于核酸内切酶及核酸外切酶识别和切除损伤部位,因此,上述结果可能是茶碱抑制染色质的多-ADP-核糖基化,使染色质的松解过程受到抑制,影响 PP 的切除,因而推迟 DNA 超螺旋的松解。

综上所述,多-ADP-核糖基化和 DNA 上 PP 切除修复的关系可初步设想如图3,即 UV 引起 DNA 损伤时,首先对暴露于外容易靠近修复酶的损伤部位进行切除修复。在 DNA 链上形成的空隙及切口引起多-ADP-核糖合成酶活性升高,于是使染色质蛋白(主要是组蛋白 H₁)发生多-ADP-核糖基化,使结构紧密的染色质松解。松解有利于 DNA 修复酶靠近损伤部位,从而促进 DNA 的修复过程。

参 考 文 献

- [1] Purnell, M. R. et al.: *Biochem. Soc. Trans.*, **8**, 215, 1980.
- [2] Durkacz, B. W. et al.: *Eur. J. Biochem.*, **121**, 65, 1981.
- [3] Halldorsson, H. et al.: *FEBS Letters*, **85**, 349, 1978.
- [4] Korp, M. T. et al.: *Anal. Biochem.*, **128**, 175, 1983.
- [5] Nisselbaum, J. S. et al.: *Anal. Biochem.*, **27**, 212, 1969.
- [6] Lavin, N. F. et al.: *J. Cell Sci.*, **48**, 283, 1981.
- [7] Rikilis, E.: in *Lymphocyte stimulation* (Amleto Castellani eds), pp. 131, Pleum press, New York and London 1980.
- [8] Cook, P. R. et al.: *Nature*, **263**, 679, 1976.
- [9] Mattern, M. R. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **697**, 6, 1982.
- [10] Pointer, G. G. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 3423, 1982.

[本文于 1984 年 9 月 19 日收到]

L615 白血病小鼠肝、脾中 cAMP 依赖的蛋白激酶活力变化

凌义和 胥 彬

(中国科学院上海药物研究所,上海)

cAMP 不仅参与细胞的多 种代谢调节过程,而且还和细胞的增殖、分化有关。cAMP 要发挥其生理效应,需通过 cAMP 依赖的蛋白激

酶才能实现^[1,2]。有报道认为肿瘤细胞的恶性行为可能和其细胞内 cAMP 水平下降有关。另有人认为肿瘤细胞内 cAMP 下降不是主要原

因,而是它依赖的蛋白激酶活力降低,从而使 cAMP 失去应有的调节功能^[3]。L 615 白血病是一种淋巴细胞白血病,主要表现为脾脏增大,脾内有大量恶性程度很高的淋巴细胞。本文比较了正常和患有 L 615 白血病小鼠肝、脾组织中 cAMP 依赖的蛋白激酶活力变化,希望从中找出白血病的发生,发展和蛋白激酶活力改变的关系。

材 料 和 方 法

1. 药品和试剂 [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP (比放射性: 26 Ci/mmol): 上海试剂一厂出品;非标记 ATP 钠盐: 中国科学院上海生化所东风生化试剂厂提供; cAMP: 中国科学院上海生化所馈赠。

2. 小牛胸腺组蛋白 取新鲜小牛胸腺组织,按文献^[4]方法提取组蛋白。

3. 瘤株和蛋白激酶的提取 取 18—22 克 615 纯种小鼠,皮下接种 L 615 白血病脾细胞悬液。接种后第 7 天,快速断头放血处死;立即取出肝、脾等组织,置于干冰中冷冻,然后称重;按比例加入 50 mM Tris-HCl, 4mM EDTA pH 7.5 的缓冲液,做成匀浆后,于 45,000 $\times$ g, 0—4℃ 离心 1.5 小时;取上清液,测定蛋白激酶的活力。

4. 蛋白激酶活力的测定 按文献方法^[5],略作修改。主要步骤为取 70 μl pH6.5 反应液(内含 50mM NaAc; 300 μM EDTA; 10 mM MgAc₂; 2mM 茶碱; 5 mM NaF; 10 mM 巯基乙醇及组蛋白 (200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$)), 加 10 μl 内含 10 n moles [$\gamma^{32}\text{P}$] ATP; 10 μl 不同浓度的 cAMP 及 10 μl 酶液。于 30℃ 温育 5 分钟,反应自加入酶液开始计算;到时取出 50 μl 上述反应液,滴入 25mm 滤纸圆片上,立即投入冷 10% TCA 中止反应;并洗涤 20 分钟,再用 5% TCA 洗 2 次,无水乙醇和乙醚各洗一次;90℃ 干燥后进行放射性测量;酶活力以 p mol ^{32}P 参入/mg 酶蛋白/分钟表示之。酶蛋白含量按 Lowry^[6] 法,用 Folin 试剂测定。

结 果

1. 正常和带瘤小鼠肝、脾组织中 cAMP 依赖蛋白激酶活力变化

正常和接种 L 615 白血病后第 7 天小鼠,分别取其肝组织,提取酶液并与不同浓度 cAMP (0.001—10 μM) 相作用。发现正常鼠和白血病鼠肝组织中的蛋白激酶活力均随 cAMP 浓度增加而上升;当 cAMP 浓度为 1 μM 时,白血病鼠肝组织内蛋白激酶活力虽趋下降,但统计不显著。这些结果表明正常和白血病鼠肝组织内 cAMP 依赖的蛋白激酶活力无明显变化(图 1)。

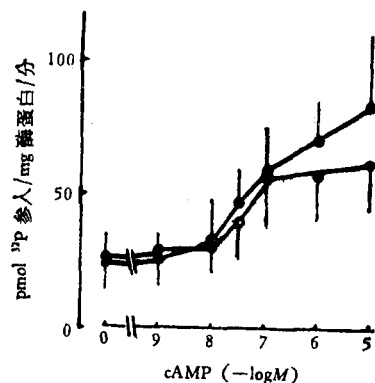


图 1 正常和 L 615 白血病鼠肝组织中蛋白激酶活力的变化 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

—●— 正常鼠 —○— L 615 白血病鼠

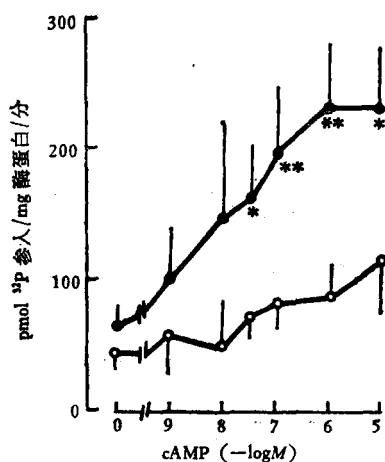


图 2 正常和 L 615 白血病鼠脾组织蛋白激酶活力的变化 ($\bar{x} \pm \text{SD}$, $n = 4$)

—●— 正常鼠 —○— L 615 白血病鼠
* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

图 2 是正常和白血病鼠脾脏内蛋白激酶活

力和 cAMP 浓度增加的变化。实验表明,当 cAMP 浓度为 0 时,白血鼠脾内蛋白激酶活力就低于正常鼠,随着 cAMP 浓度增加,正常鼠脾内酶活力明显增高,而白血鼠脾组织内蛋白激酶活力明显低于正常鼠。动力学分析表明,两者的 K_m 值相似,只是白血鼠脾脏蛋白激酶的 V_{max} 降低了。

2. 接种 L 615 白血病细胞后不同时间脾内蛋白激酶活力变化

取正常或接种 L 615 白血病细胞后不同天数的小鼠,断头放血处死后,迅速称取其脾重及测定 cAMP 依赖(+1 μ M cAMP)和 cAMP 不依赖(-1 μ M cAMP)蛋白激酶的活力,结果见图3。实验表明,在接种 L 615 白血病后细胞 4 天内,脾重变化不大,酶活力变化也不大。但接种后 5 至 7 天,脾重急剧增加,而蛋白激酶活力,特别是 cAMP 依赖的蛋白激酶活力明显降低,两者呈负相关(图 3)。

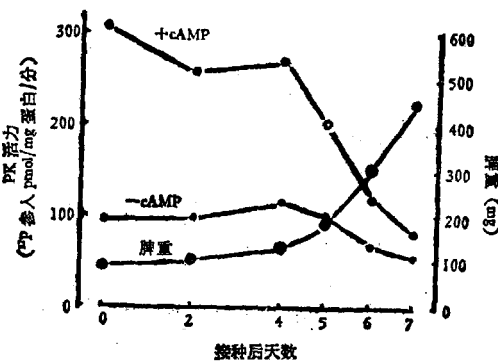


图 3 接种 L 615 白血病细胞后不同时间,小鼠脾重,cAMP 依赖和不依赖的蛋白激酶的变化

3. 正常和白血鼠的其他组织中蛋白激酶活力变化

取正常和接种 L 615 白血鼠后 7 天鼠的胸腺、脑、肾组织,比较这些组织中蛋白激酶活力变化。结果见表 1。实验表明,白血鼠内胸腺组织中蛋白激酶活力有升高趋势,但肾组织中却呈下降趋势,而脑组织中变化不明显。

讨 论

目前所知,cAMP 通过与 cAMP 依赖的蛋白激酶的调节亚基(R)相结合,进而激活该酶的催化亚基(C),参与细胞代谢和基因调节机制有关的磷酸化过程。Cho-Chung^[7]认为肿瘤细胞由于蛋白激酶的调节亚基与 cAMP 结合率降低,以至催化亚基活力下降,从而影响 cAMP 的调控作用。Majumder 等^[8]报道小鼠乳癌蛋白激酶活力明显下降;Ortez 等^[9]发现荷 B₁₆ 黑色素瘤小鼠的胸腺、脾组织中蛋白激酶活力下降,并认为可能和患有瘤鼠免疫 T 淋巴细胞数减少有关。但也有报道说肿瘤细胞与正常组织细胞相比,其蛋白激酶的活力没有改变,甚至还有增加^[10,11]。本文的结果表明,L 615 白血鼠的肝、肾、脑组织中的蛋白激酶活力虽有降低趋势,但统计不显著,而有明显病变的脾组织内蛋白激酶的活力显著降低,而且其降低和肿瘤发展呈负相关,表明肿瘤细胞内蛋白激酶活力明显降低。如果肿瘤细胞,特别是白血鼠细胞内蛋白激酶活力降低是一种普遍现象,则可将该酶活力检测作为诊断或判定化疗疗效和病情预后的一种手段,还可用它深入研究蛋白激酶的作用机制,并为研究新型的抗癌药物提供线索。

cAMP 依赖的蛋白激酶为一同功酶,目前发现该酶有 I 和 II 两种亚型。Costa^[12]发现中国仓鼠卵细胞的蛋白激酶 I 和 II 活力,随细胞

表 1 正常和 L615 白血鼠的胸腺、脑和肾中蛋白激酶活力(Pmol ³²P 参入/mg 蛋白/分)的变化 ($\bar{x} \pm SD$, $n = 3$)

	胸 腺		脑		肾	
	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP	-cAMP	+cAMP
正常鼠	75 $\pm$ 19	136 $\pm$ 15	423 $\pm$ 113	580 $\pm$ 35	63 $\pm$ 12	211 $\pm$ 26
白血鼠	152 $\pm$ 52	274 $\pm$ 120	349 $\pm$ 29	594 $\pm$ 128	36 $\pm$ 8*	157 $\pm$ 32

*: $P < 0.05$.

周期改变而波动。在 S 期,酶 I 活力最高,而酶 II 活力明显降低;而在 G1 期则酶 II 活力明显增高,酶 I 活力下降。有些报道认为肿瘤细胞与正常细胞相比,蛋白激酶 I 活力无明显变化,而蛋白激酶 II 活力显著降低。我们实验表明 L 615 白血病小鼠脾内蛋白激酶活力明显降低,但这是否与蛋白激酶 II 活力降低有关,尚待研究。

参 考 文 献

- [1] Anderson, W. B. et al.: *Adv. Cyclic Nucleotides Res.*, 5, 681, 1975.
- [2] Krebs, E. G.: *Curr. Top. Cell Regul.*, 5, 99, 1972.
- [3] Cho-Chung, Y. S.: *Influence of Hormones on Tumor Development* (Kellen, J. A. et al. eds),

- Vol. 1, p. 56, CRC Press, Cleveland.
- [4] John, E. W.: *Biochem. J.*, 92, 55, 1964.
- [5] Corbin, J. D. et al.: *J. Biol. Chem.*, 218, 1813, 1973.
- [6] Lowry, O. H. et al.: *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
- [7] Cho-Chung, Y. S.: *J. Cyclic Nucleotides Res.*, 6, 163, 1980.
- [8] Majumder, G. C. et al.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 74, 1140, 1977.
- [9] Ortez, R. A. et al.: *J. Cyclic Nucleotides Res.*, 4, 87, 1978.
- [10] Fossberg, T. M. et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 187, 372, 1978.
- [11] Malkinson, A. M. et al.: *Biochem. J.*, 168, 319, 1977.
- [12] Costa, M. et al.: *J. Biol. Chem.*, 251, 3313, 1976.

[本文于 1984 年 12 月 20 日收到]

植物生长激素的细胞凝集效应

聂延富 董今才 唐盘昌

(山东大学微生物研究所, 济南)

凝集素的发现已近 100 年。最初 H. Stillmark 发现蓖麻籽提取液可使红细胞凝聚。后来发现不但在植物种子中,而且在植物的其他部位如马铃薯块茎、番茄汁、延命菊叶子、某些葫芦科植物的韧皮部以及病毒、细菌、真菌、无脊椎动物和脊椎动物各类组织如兔肝,小鼠腺胸、牛肺、人肝中都含有凝集素。其中以豆科植物凝集素的含量最丰富,如大豆、刀豆蛋白质中凝集素占 1.5—3%^[1,2]。

凝集素能凝集红血球、淋巴细胞、成纤维细胞、癌细胞、精子和细菌,有的还有清除血中糖蛋白,促细胞分裂,免疫和毒性等作用^[1,2]。鉴于豆科植物凝集素含量高、分布面广,并能凝集、识别根瘤菌^[3]使其便于侵入根部促进细胞分裂形成根瘤;而 2,4-D 也能凝集、诱导根瘤菌使其侵入由 2,4-D 促细胞分裂形成的根瘤原基中,在小麦等植物上结根瘤^[4]。从而想到 2,4-D 是否兼具凝集素的作用。一般凝集素多由生物体中提取,而人工合成的激素很少引起人们的注意,而我们初步发现经 2,4-D 处理后的根表面附着的根瘤菌远比未处理的对照组多而难冲洗掉,而且 2,4-D 还可以使根瘤菌分散的菌体凝集。为了进一步确证其凝集效应,我们选用了动物细胞进行实验,并比较了 2,4-D 与抗血

清、PEG 等的凝集作用。

材 料 与 方 法

一、材料

1. PEG、NAA 和 2,4-D (均为国产试剂)溶液的配制 一般认为 PEG 分子量为 400—6000,浓度由 40—60% 时,可使细胞融合^[6]。悬浮细胞的融合率为 6%,单层细胞为 10—20%。PEG 6000 毒性小,但浓度大于 50% 时毒性增大,可损伤细胞膜^[6]。为了与 NAA 和 2,4-D 作比较,三者的浓度均采用 0.5%。但 NAA、2,4-D 难溶于水,用生理盐水配好的 5% 溶液,经加热灭菌后,仍有大量沉淀,故实际为饱和溶液。PEG 亦用生理盐水配制、灭菌。冷却后在室温下使用。

2. S-180 腹水瘤细胞抗血清的制备 为了观察 NAA 和 2,4-D 对小鼠 S-180 腹水瘤有无疗效,用抗血清进行比较。抗原取自用致死量瘤细胞攻击后七天的小白鼠腹水,用生理盐